

Genetically modified mice- Methods, applications and outlook

Eskandarian Boroujeni M¹, Alizadeh R², Afkhami F³, Tavakol Z⁴, Shamsara M⁵

1. Department of Stem Cells and Regenerative Medicine, Faculty of Medical Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran.

2. Assistant Professor, ENT and Head & Neck Research center and department, Hazrat Rasoul Hospital, The Five Senses Institute, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

3. Department of Medical Genetics, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

4. Assistant Professor, Department of Midwifery, Faculty of Nursing and Midwifery, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran.

5 Assistant Professor, National Research Center for Transgenic Mouse, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran, (Corresponding Author) Tel: +98-21-44787414, Email: shamsa@nigeb.ac.ir

ABSTRACT

Background & Aim: Transgenic mice, of tengenerated by random integration of foreign genes into the mouse genome or by targeted mutation in a particular gene, have demonstrated to be a very effective tool for studying gene function in living things. In this review article, we discussed on the current methods of generating genetically-modified mice and their related problems and then investigated the new methods developed to overcome these problems. Finally, we discussed future prospects on the gene targeting.

Methods & Materials: This is a review article, which has been written after searching Pubmed, Scopus, Google Scholar, Springer, Elsevier and Magiran databases by using keywords of transgenic mice, functional genetics, genetargeting, and homologous recombination.

Results: This study dealt with genetic variations in a wide range, differential processing and inactivation of gene-specific isoforms, local and induced genetic changes, Cre/loxP system and some future perspectives.

Conclusion: Success rate in genetic modification of mouse genome has increased dramatically, and use of knockout mice has resulted in increased knowledge of human biology and diseases.

Keywords: Transgenic mice, Functional genetics, Genes targeting, Homologous recombination

Receviend: Jan 10, 2019

Accepted: May 27, 2019

How to cite the article: Eskandarian Boroujeni M, Alizadeh R, Afkhami F, Tavakol Z, Shamsara M. Genetically modified mice- Methods, applications and outlook. SJKU 2019; 24 (1): 24-44.

موش‌های تراریخته - روش‌ها، کاربردها و چشم انداز

مهدی اسکندریان بروجنی^۱، رفیعہ علیزاده^۲، فاطمه افخمی^۳، زینب توکل^۴، مهدی شمس‌آرا^۵

۱. دپارتمان سلولهای بنیادی و پزشکی بازساختی، دانشکده بیوتکنولوژی پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران.
۲. استادیار، مرکز تحقیقات گوش، گلو، بینی و سرو گردن، بیمارستان حضرت رسول اکرم (ص)، پژوهشکده سلامت حواس پنجگانه، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران، تهران، ایران.
۳. گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
۴. استادیار، گروه مامایی، دانشکده پرستاری و مامایی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.
۵. استادیار، مرکز ملی تحقیقات موش تراریخته، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، (نویسنده مسئول) تلفن ثابت: ۰۲۱-۴۴۷۸۷۴۱۴، ایمیل: shamsa@nigeb.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: موش‌های تراریخته، که اغلب توسط ادغام تصادفی یک ژن خارجی به درون ژنوم‌شان و یا توسط جهش هدفمند در یک ژن ویژه بوجود می‌آیند، ابزار بسیار موثری برای مطالعه عملکرد ژن، در بدن موجود زنده می‌باشند. در این مقاله مروری، ابتدا روشهای رایج تولید موشهای تراریخته و مشکلات مرتبط با آنها مورد بررسی قرار می‌گیرد و سپس روشهای جدیدی که برای غلبه بر این مشکلات توسعه یافته‌اند، مورد کنکاش قرار می‌گیرند و در انتها چشم اندازهای آتی درباره هدف‌گیری ژنها مطرح می‌شوند.

روش بررسی: این مطالعه به صورت مروری در پایگاه‌های اطلاعاتی Pubmed, Scopus, Google Scholar, Magiran و Springer, Elsevier و با استفاده از کلمات کلیدی transgenic mice, functional genetics, target genes, homologous recombination در بازه زمانی ۲۰۱۸-۱۹۸۰ انجام شده است.

یافته‌ها: در این مطالعه به بررسی تغییرات ژنی در سطح وسیع، پردازش افتراقی و غیرفعال سازی ایزوفرم‌های اختصاصی ژن، تغییرات ژنی القایی و موضعی، سیستم Cre/loxP و برخی چشم اندازهای آتی پرداخته شده است.

نتیجه‌گیری: میزان موفقیت برای دست‌ورزی ژنی در ژنوم موش بطور چشمگیری افزایش یافته است و استفاده از موشهای ناک اوت^۱ منجر به کسب دانش عظیمی در زمینه زیست‌شناسی انسان و بیماریها گردیده است.

واژه‌های کلیدی: موش‌های تراریخته، ژنتیک عملکردی، هدف‌گیری ژنها، نو ترکیبی همولوگ

وصول مقاله: ۹۷/۹/۲۱ اصلاحیه نهایی: ۹۷/۱۲/۱ پذیرش: ۹۷/۱۲/۸

¹Knockout Mice

مقدمه

امروزه با شناسایی توالی ژنوم انسان و موش، توجه به روی کشف عملکرد ژنها و تاثیر آن ها بر سلامتی انسان متمرکز شده است، چراکه ممکن است این ژنها نقش درمانی و یا پیشگیری کننده ایفا کنند (۱،۲). آنالیز جهش های ژنتیکی القایی در موجوداتی نظیر کرمها، حشرات، ماهی گوره خری^۲ و موش، درک و شناخت ما را از عملکرد ژنها در این موجودات به میزان قابل توجهی افزایش داده است. از میان این موجودات مدل، موش مزیت های ویژه ای را برای مطالعه بیماری ها در انسان ارایه می دهد. نخست آنکه، موش جزء پستانداران محسوب میشود و از لحاظ تکوین، فیزیولوژی، رفتار و بیماریها اشتراکات قابل توجهی با انسانها دارد؛ دوم آنکه، تقریباً ۹۹٪ ژنهای موش دارای همولوگ در انسان هستند؛ و بالاخره، ژنوم موش دارای این ویژگی است، که از جهش زایی هدفمند در برخی از ژنهای ویژه که توسط نوترکیبی همولوگ در سلولهای بنیادی جنینی^۳ (ESCs) صورت می پذیرد، پشتیبانی می کند، که این امر باعث می شود که ژنها بطور کارآمد و دقیقی تغییر داده شوند.

این مقاله مروری، ابتدا به بررسی مشکلات عمومی مرتبط با ایجاد موش های تراریخته می پردازد، و سپس، چندین روش جدید و پیشرفته را که برای غلبه بر مشکلات کنونی توسعه یافتند، را مورد بحث قرار می دهد.

روش بررسی

این مطالعه به صورت مروری در پایگاه های اطلاعاتی Pubmed, Scopus, Google Scholar, Springer, Elsevier و Magiran و با استفاده از کلمات کلیدی transgenic mice, functional genetics, target genes, homologous

^۲Zebrafish

^۳Embryonic Stem Cells

recombination در بازه زمانی ۲۰۱۸-۱۹۸۰ انجام شده

است.

یافته ها

تغییرات ژنی در سطح وسیع

غیرفعال سازی ژن در سطح وسیع در موشها، بوسیله نوترکیبی همولوگ در ESCs صورت می پذیرد. در این روش، معمولاً اگزون های مهم و یا کل ژن (بسته به اندازه آن) بوسیله یک نشانگر انتخابی، که در اکثر موارد کاست مقاومتی نومایسین^۴ است، جایگزین می شود (۳). در ذیل برخی از مسایل مرتبط با این روش مورد بررسی قرار می گیرد.

نخست، در موشهای ناک اوت سنتی، حذف ژنی در تمام مراحل رشد و تکوین موش و در همه سلولهای آن وجود دارد. این امر اغلب باعث ایجاد مشکلاتی در تکوین میشود، که برخی از آنها می توانند کشنده باشند و توانایی ما را برای مطالعه فنوتیپ محدود کند. بعنوان مثال، مسیر علامت دهی Wnt نقش مهمی در تکوین جنینی بسیاری از گونه ها ایفا می کند. برای نمونه این مسیر برای تکوین صحیح اندامهایی مانند مغز، دستگاه گوارش، کبد، قلب، پوست و استخوان مورد نیاز است. بسیاری از مدل های ناک اوت موشی، که در آنها ژنهای مسیر علامت دهی Wnt دست ورزی شده است، در طی جنین زایی و یا بلافاصله بعد از تولد می میرند، که این مسئله باعث ایجاد محدودیت در مطالعات مسیر علامت دهی Wnt می شود (۴). دوم، فقدان عملکرد یک ژن ویژه، اغلب توسط بیان تغییر یافته سایر ژنها جبران می شود، که تفسیر نقش اصلی ژن تغییر یافته را دشوار می سازد (۵).

این مشکلات مرتبط با موشهای ناک اوت سنتی، توسط استراتژی های هدفگیری ژن بصورت القایی و موضعی حل شده است. بعلاوه تجربیات ما در مورد موشهای هدف

^۴Neomycin Resistance Cassette

گیری شده ژنی، اهمیت سابقه ژنتیکی مدل‌های موشی جدید و همچنین اهمیت انتخاب صحیح موش‌های کنترل طبیعی را برای ما آشکار نمود (۶).

سابقه ژنتیکی

سابقه ژنتیکی موش‌های مدل، اغلب اثر قابل توجهی بر روی فنوتیپ دارد. مسلماً، بیان محصولات ژن‌های جبران کننده و تعدیل کننده، فنوتیپ اولیه که توسط روش هدف گیری ژن ایجاد شده، را بطور وسیعی تحت تاثیر قرار می دهد. اکثر ESCs موشی از سویه های ۱۲۹ مانند SV۱۲۹ مشتق شده‌اند. موش های این سویه همگی رنگ موی آگوتی دارند. برای تشخیص انتقال آلل جهش یافته به سلول های جنسی براساس رنگ موی موش، سلولهای بنیادی حامل آلل جهش یافته به بلاستوسیسست‌های گرفته شده از موش سیاه رنگ (مثل C57BL/6) تزریق می شوند تا موش های کایمر متولد شوند. بک کراس^۵ کایمرها، که حامل آلل جهش یافته هستند، با سویه ای که خواهان بررسی صفت در آن هستیم باعث می شود تا سابقه ژنتیکی مورد نظر بدست آید. برای رسیدن از یک رده با سابقه ژنتیکی مخلوط به رده ای با سابقه ژنتیکی نسبتاً خالص نیاز به ۹ الی ۱۰ نسل زاد و والد نیاز است. این امر ممکن است تا ۲ سال طول بکشد، بنابراین، بهتر است آزمایشات اولیه در موش هایی که سابقه ژنتیکی مخلوط کمتری دارند انجام شوند (۷-۹).

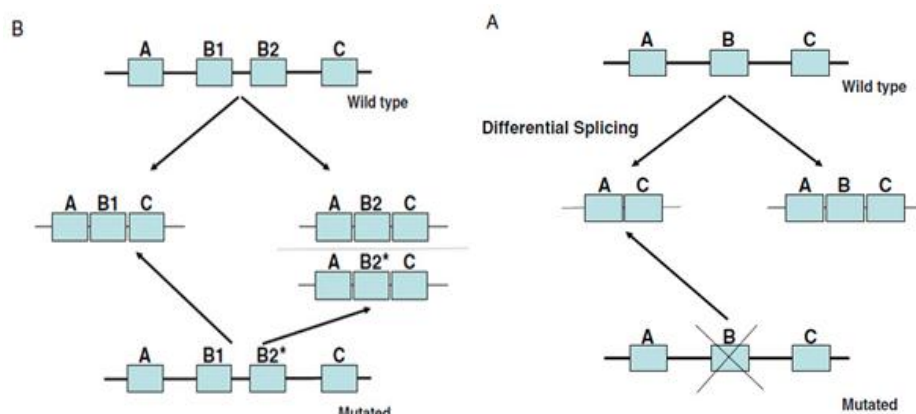
پردازش افتراقی و غیرفعال سازی ایزوفرم های اختصاصی ژن

برای هدف گیری ژن، بررسی کاملی از ساختار ژن و رونوشت های متعدد و محتمل آن مورد نیاز است. بنابراین، رابطه "یک ژن، یک پروتئین" اغلب نادرست است، چرا که یک ژن ممکن است، چندین رونوشت و یا گونه های متغیر یک پروتئین را تولید کند. پردازش افتراقی رونوشت اولیه، فرایندی رایج و مختص سلول می باشد. این فرایند، منجر به تولید پروتئین هایی می گردد، که تعداد آنها از تعداد

ژنهای موجود در ژنوم به مراتب بیشتر است. تخمین زده می شود که بیش از ۵۰٪ همه رونوشت های اولیه انسانی، فرایند پردازش افتراقی را پشت سر می گذرانند، که ممکن است این مطلب برای سایر پستانداران نیز صادق باشد (۱۰). بسته به طراحی وکتور هدف، هدف گیری ژن بصورت کلاسیک می تواند/نمی تواند، تمام ایزوفرم های یک پروتئین که مشتق شده از ترجمه رونوشت های مختلف است، را مختل نکند. بنابراین، راهکارهایی توسعه یافتند، که بتوانند بطور اختصاصی ایزوفرم های مختلف یک پروتئین را که مشتق شده از یک رونوشت اولیه هستند، را غیر فعال سازد. همانطور که در شکل ۱ شرح داده شده است، حداقل دو وضعیت مختلف بایستی در نظر گرفته شود. نخست، اگر پردازش افتراقی منجر به ایجاد یک اگزون اضافه شود، روش هدف گیری بایستی این اگزون را نشانه گرفته و آن را حذف کند. دوم، اگر دستگاه پردازش از گونه های مختلف یک اگزون مشخص استفاده می کند، تعداد اگزونها در رونوشت ها باید برای همگی یکسان باشد. برای این منظور، استراتژی برای غیرفعال کردن یک رونوشت منفرد توسعه یافته است. با کمک روش ناک این^۶، یک کدون پایان در چارچوب خواندن اگزون مربوطه وارد میشود که منجر به پایان زودرس ترجمه می شود. در بقیه ایزوفرمها، اگزون جهش یافته بعنوان یک توالی اینترونی از رونوشت خارج شده، که در نهایت رونوشت های طبیعی، تغییر نیافته باقی می ماند (۷). متأسفانه، این روش غیرفعال کردن ایزوفرمها، امکان ایجاد جهش های دوتایی را بوسیله تولید جهشهای منفرد فراهم نمی سازد (بطور مثال غیرفعال کردن همزمان دو ایزوفرم). بعلا پیوستگی نزدیک گونه های مختلف یک اگزون مشخص، آلل جهش یافته همواره همراه اگزون (های) طبیعی متناوب است.

^۶ Knockin

^۵ Backcross



شکل ۱. پردازش افتراقی. a. در این مثال، پردازش افتراقی منجر به ایجاد یک اگزون اضافه شده است (exon B). در این مورد، روش هدفگیری، اگزون B را نشانه گرفته و آن را حذف می کند و پردازش طبیعی رونوشتی محتوی اگزون های A و C را ایجاد میکند. b. در این مورد، دستگاه پردازش از گونه های مختلف اگزون B (B1 و B2) استفاده می کند. بطور مثال، برای غیرفعال اختصاصی رونوشت حاوی اگزون B2، یک آلل جهش یافته دارای کدون پایان در چارچوب خواندن اگزون B2 (B2*) وارد میشود، که منجر به پایان زودرس ترجمه می شود. رونوشت حاوی B1، B2* بعنوان یک توالی ایترونی از رونوشت خارج شده، که در نهایت رونوشت طبیعی دارای اگزون B1، باقی می ماند (v).

تغییرات ژنی القایی و موضعی

سیستم Cre/loxP و سایر سیستم های ریکامیناز^۷ مشتق شده از فاژ با در نظر گرفتن مشکلات مرتبط با غیرفعال سازی ژن بطور وسیع، نظیر مرگ در حالت جنینی، روشهای توسعه یافتند که جهش هایی که محدود به اندامها و بافت های ویژه هستند، را امکان پذیر می سازند و در عین حال بیان ژن طبیعی را در بقیه بدن حفظ می کنند. این روشها براساس فعالیت ریکامیناز مبتنی بر جایگاه ویژه هستند، که بیان آنها براساس پروموتورهای اختصاصی بافتها کنترل می شود. ریکامیناز Cre فراوانترین آنزیمی است، که بدین منظور استفاده می شود (۱۱). ریکامیناز Cre یک توپوایزومراز^۸، گرفته شده از باکتریوفاژ P1 است، که نوترکیبی در جایگاه های ویژه DNA که بین توالی های شناسایی خاص قرار گرفته اند، را کاتالیز می نماید (۱۲). توالی ویژه Cre، یعنی loxP^۸ شامل یک توالی ژنتیکی ۲۴ بازی است که در ژنوم موش طبیعی وجود ندارند. همانطور که در شکل ۲

نشان داده شده، نوترکیبی مبتنی بر Cre، بین جایگاه های loxP منجر به حذف توالی ژنتیکی میانه شده (loxP) در جهت های یکسان قرار میگیرد) و یا منجر به وارونه سازی توالی ژنتیکی قرار گرفته بین جایگاه های loxP می شود (loxP) در جهت های مختلف قرار میگیرد). گرچه، این سیستم از پروکاریوتها گرفته شده است، ریکامیناز Cre در سلولهای یوکاریوتی هم فعال است، و به سهولت به هسته سلول انتقال می یابد و نیازی به کوفاکتور ندارد. بنابراین، ایجاد حذف ژنی بطور موضعی در موش مستلزم ایجاد دو رده موشی مستقل می باشد: یک رده موشی، که ریکامیناز Cre را تحت کنترل یک پروموتور ویژه بافتی بیان می کند و رده موشی دوم، که ژن مورد نظر (و یا اگزون های مهم این ژن) در کنار جایگاه های loxP قرار گرفته اند. سپس این دو رده مستقل، با هم آمیزش داده می شوند تا حذف ژنی بطور موضعی حاصل یابد. باوجود سادگی و قدرتمندی سیستم های Cre/loxP چندین اشکال وجود دارد. نخست، سیستم های Cre/loxP هیچگونه کنترلی روی زمان نوترکیبی در حین تکوین موش ندارند. دوم، بسیاری از

⁷ Recombinase

⁸ Locus of X-over of P1

Cre را مشخص می‌سازد، ولی الزاما مشخص نمی‌کند که موشی با بیان Cre برای حذف سایر توالی که در جایگاه loxP قرار گرفته اند مناسب می باشد یا نه. بنابراین یک موش با بیان Cre ممکن است، بخوبی توالی که در جایگاه loxP قرار گرفته (مثل توالی پایان در گونه گزارشگر) را حذف نماید، ولی برای توالی‌های دیگر موفق عمل نکند. بهره‌گیری از ریکامینازهای گرفته شده از فاژها برای هدف‌گیری ژنها تنها محدود به ریکامیناز Cre نیست. در واقع، ریکامیناز Dre که از باکتریوفاژ D6 بدست آمده است بطور موثری نوترکیبی در جایگاه‌های rox قابل سلولهای یوکاریوتی و موش را انجام می دهد (۱۵، ۱۴). قابل ذکر است، که Dre و Cre با توالی شناسایی یکدیگر واکنش نمی دهند و بنابراین، این امر مزیتی برای انجام دو رویداد مستقل نوترکیبی در یک رده موشی می باشد. مشابه Dre، ادغامگر $\Phi C31^{12}$ که همچنین از باکتریوفاژ گرفته شده است، در حذف‌های ژنی در موش موفق عمل می کند (۱۶). بطور کلی ادغامگر $\Phi C31$ وظیفه حذف توالی ژنتیکی که در کنار جایگاه‌های شناسایی attP و attB قرار گرفته اند را برعهده دارد. زمانی که سیگنال مکان‌یابی هسته^{۱۳} به این ادغامگر وصل می شود به نظر می رسد کارآمدی آن در حذف توالی ژن هدف، مشابه ریکامیناز Cre باشد (۱۷). با در نظر گرفتن تعداد اندک رده های موشی که توسط Dre و $\Phi C31$ ایجاد شده اند، هنوز بسیار زود است که یک قضاوت روشنی در مورد اینکه آیا این سیستم‌های جایگزین، کارآمدی سیستم Cre/loxP را دارند، داشته باشیم.

پروموتورهای اختصاصی بافتی، اجازه بیان ریکامیناز Cre به میزان کافی را در تمام سلولهای یک بافت مشخص را نمی دهند، تا فرایند حذف ژنی بطور موثر رخ دهد. بنابراین، ممکن است نوترکیبی به میزان متفاوت در یک بافت مشخص رخ دهد، که این امر منجر به ایجاد الگوهای حذف ژنی بطور موزاییکی می گردد. سوم، کارآمدی حذف ژنی، وابسته به جایگاه ژنتیکی است، که در آن، loxP واقع شده است. بنابراین، دسترس ریکامیناز Cre به جایگاه loxP وابسته به ساختار سوم DNA است. برخی از مناطق DNA ژنومیک به نوترکیبی مبتنی بر Cre نسبتا مقاوم است و باعث کارآمدی کم نوترکیبی میشود. متأسفانه، این مسئله کاملا غیرقابل پیش‌بینی است. همانطور که در موشهای تراریخته کلاسیک دیده می‌شود، بیان Cre، تحت کنترل پروموتورهای اختصاصی بافتی، وابسته به جایگاه ادغام قطعه خارجی است. روش رایج این است که چندین رده موشی که Cre را بیان می‌کنند، ایجاد شود و سپس میزان بیان و مکان Cre ارزیابی گردد، تا موثرترین رده برای آزمایشهای آتی با رده موشی دارای جایگاه loxP، شناسایی گردد. ارزیابی مکان و فعالیت Cre در بدن موجود زنده، توسط "موشهای گزارشگر"^۹ صورت می پذیرد. در این تکنیک، رده موشی با بیان Cre با رده موشی دیگر که در آن یک قطعه خارجی گزارشگر (نظیر بتا گلوکتوزیداز^{۱۰}، پروتئین فلورسانس سبز^{۱۱}) تحت کنترل پروموتورهای قوی بیان می شود، آمیزش داده می شود (۱۳). در غیاب فعالیت Cre، بیان این گزارشگر توسط حضور یک توالی پایان که در کنار جایگاه loxP قرار گرفته است، بلوکه می شود. وقتی که توالی پایان توسط ریکامیناز Cre حذف می‌شود، گزارشگر در سلولهایی که دارای فعالیت Cre هستند، بیان می شود (شکل ۳). متأسفانه گرچه این روش مکان فعالیت

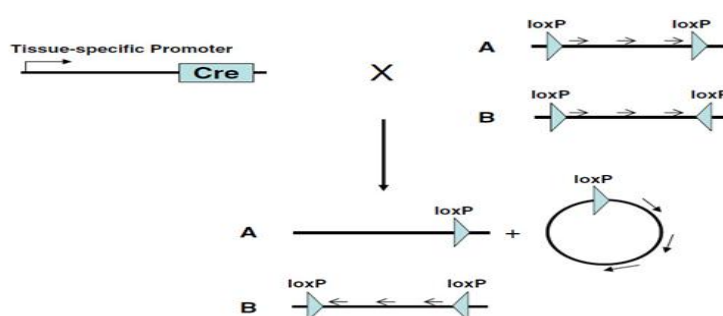
¹²Integrase

¹³Nuclear Localization Signal

⁹Reporter Mice

¹⁰ β -galactosidase

¹¹Green Fluorescent Protein(GFP)



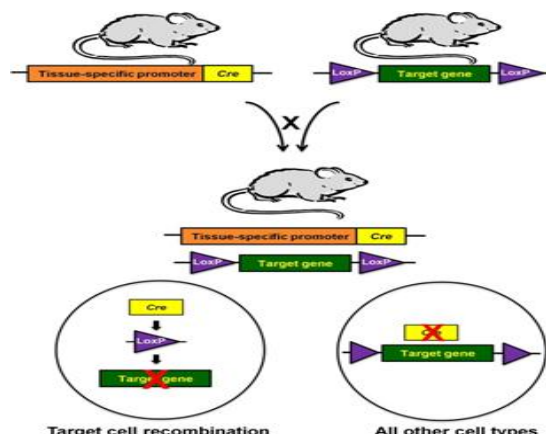
شکل ۲. سیستم Cre/loxP. ایجاد حذف ژنی بطور موضعی در موش مستلزم ایجاد دو رده موشی مستقل می باشد: یک رده، که ریکامیناز Cre را تحت کنترل یک پرموتور ویژه بافتی بیان می کند و رده موشی دوم، که در طرفین ژن مورد نظر جایگاه های loxP قرار گرفته اند. سپس این دو رده مستقل، با هم آمیزش داده می شوند، تا حذف ژنی بطور موضعی حاصل یابد. در مورد **a**، loxP در جهت های یکسان قرار میگیرد، نوترکیبی مبتنی بر Cre، بین جایگاه های loxP منجر به حذف توالی ژنتیکی میانه شده است. در مورد **b**، loxP در جهت های مختلف قرار میگیرد، و نوترکیبی مبتنی بر Cre منجر به وارونه سازی توالی ژنتیکی قرار گرفته بین جایگاه های loxP می شود (v).

سیستم Cre/loxP: روشی مفید برای دنبال کردن

دودمان سلولی

جدا از سودمندی این سیستم در هدف گیری ژنها، می توان از سیستم Cre/loxP برای دنبال کردن دودمان سلولی در حین رشد و تکوین بهره برد. بدین منظور، Cre برای حذف غیر قابل برگشت توالی پایان که در کنار جایگاه loxP قرار گرفته اند، استفاده می شود، که منجر به فعال سازی بیان گزارشگر در دودمان سلولی مورد نظر می گردد. بنابراین، در طی تکوین هر زمان Cre فعال شد، همه سلولهایی که از آن سلول ویژه منشا می گیرند، ژن گزارشگر را بیان می کنند، صرف نظر از اینکه آیا هنوز بیان Cre در آن سلولها وجود دارد یا ندارد. این روش برای دنبال کردن سرنوشت سلولهایی که پروتئاز رنین^{۱۴} را در طی تکوین جنینی بیان می کنند، مورد استفاده قرار گرفته است (۱۸).

¹⁴Protease Renin



شکل ۳. تولید موشهای Cre/loxP. در این روش، رده موشی با بیان Cre که تحت کنترل پروموتورهای اختصاصی بافتی است با رده موشی دیگر که حاوی یک قطعه خارجی گزارشگر (نظیر پروتئین فلورسانس سبز) است، آمیزش داده می شود. در غیاب فعالیت Cre، بیان این گزارشگر توسط حضور یک توالی پایان که در کنار جایگاه loxP قرار گرفته است، بلوکه می شود. وقتی که توالی پایان توسط ریکامیناز Cre حذف می شود، ژن گزارشگر در سلولهایی که دارای فعالیت Cre هستند، بیان می شود [۴۱].

دو دست‌ورزی ژنتیکی مستقل در یک رده موشی منفرد را فراهم سازند.

غیرفعال سازی ژن بصورت القایی (گیرنده های استروژنی، سیستم tet)

سیستم های Cre و Flp، غیرفعال سازی ژن بطور موضعی را فراهم می سازند. هرچند، هیچ کنترلی روی زمان نوترکیبی وجود ندارد. چراکه بیان و فعالیت Cre کلاً به پروموتورهای اختصاصی بافت انتخابی بستگی دارد. از اینرو، فعالیت Cre و متناوباً غیرفعال سازی ژن در بافت هدف ممکن است، در مراحل اولیه تکوین جنینی روی دهد، که منجر به غیرفعال سازی سیستم های جبرانی می شود، که ممکن است تفسیر فنوتیپ حاصله را دشوار سازد. همچنین، غیرفعال سازی ژن در زمان جنینی منجر به مرگ می شود. بهره گیری از سیستم سنتی Cre برای حذف ژن بطور موضعی ممکن است منجر به پیچیده شدن شرایط شود، چراکه پروموتور اختصاصی بافتی که فعالیت Cre را در موش بالغ کنترل می کند، ممکن است این پروموتور، در طی

سیستم Flp/FRT: آنالوگ یوکاریوتی سیستم Cre/loxP

سیستم Flp/FRT یک جایگزین برای سیستم Cre/loxP است. Flp، یک ریکامیناز یوکاریوتی است، که از مخمر گرفته می شود. مشابه Cre، Flp می تواند برای حذف توالی ژنتیکی که در کنار همولوگ loxP یعنی FRT قرار گرفته اند، استفاده شود. در مقایسه با Cre، کارآمدی نوترکیبی در سیستم Flp/FRT ضعیف است. از اینرو، با ایجاد جهش هایی در Flp، باعث پایداری بهتر آن در دمای ۳۷ °C و بهبود کارآمدی نوترکیبی در ژنوم موش شده اند [۱۷]. تاکنون، مدل های موشی کمی با استفاده از سیستم Flp/FRT تولید شده اند، و هنوز مشخص نیست، این مسئله بعلت کارآمدی ضعیف سیستم Flp/FRT است و یا اینکه این روش جدید بایستی با سیستم شناخته شده Cre/loxP رقابت کند. با اینحال، بنظر می رسد سیستمهای Flp/FRT و Cre/loxP با یکدیگر واکنش نمی دهند، و بنابراین این سیستم ها ممکن است امکان موفقیت در ایجاد

تکوین در بافتهایی بجز آن بافتهایی که در مرحله بالغ وجود دارند فعال باشد؛ و این مسئله موجب حذف ناگهانی ژن در تمام سلولهای آن دودمان سلولی می شود.

این مشکلات منجر به توسعه روشهای جایگزین برای حذف ژن بصورت وسیع و یا موضعی شده است. در حال حاضر، دو روش وجود دارد که می توانند حذف ژنی را در زمان مشخص در موش انجام دهند: سیستم Cre/گیرنده استروژن و سیستم وابسته به تتراسایکلین^{۱۵}.

سیستم Cre/گیرنده استروژن، براساس ماهیت گیرنده های استرویدی استوار است، که بطور عمومی در سیتوپلاسم واقع شده اند. زمانیکه لیگندهای مربوطه به گیرنده خود متصل می شوند، این کمپلکس به هسته سلولی منتقل می یابد تا رونویسی از ژن را القا کند. بنابراین، زمانیکه ریکامیناز Cre به یک گیرنده استرویدی متصل می شود (مثل گیرنده استروژن)، انتقال ریکامیناز Cre به هسته که محل انجام نوترکیبی است، توسط استروژنها هدایت می شود. درغیاب استروژنها، توانایی انتقال هسته ای ریکامیناز Cre توسط گیرنده استروژنی بلوکه می شود. هرچند، انتقال هسته ای ریکامیناز Cre توسط استرادیول^{۱۶} های داخلی نیز انجام می شود، که نمی توان آنها را بطور آزمایشگاهی دست ورزی نمود. این مسئله بوسیله جهشی در جایگاه اتصال استروژن در پروتئین ترکیبی Cre/گیرنده استروژن حل شده است. از اینرو، جایگاه گیرنده به استرادیولهای داخلی غیرحساس است، ولی به OH-۴ تاموکسیفن^{۱۷} حساس است. بنابراین، رونویسی پروتئین ترکیبی Cre/گیرنده استروژن در موشهای تراریخته، توسط یک پروموتور فراگیر و یا اختصاصی بافت کنترل می شود و عمل ترجمه در سیتوپلاسم روی می دهد. زمانیکه OH-۴ تاموکسیفن به موش تزریق می شود، Cre به هسته منتقل می شود و

عملیات حذف قطعه ژنتیکی که در کنار جایگاه loxP قرار گرفته است، را انجام می دهد. گرچه، در اصل این روش کنترل زمانی را برای تحریک رویداد نوترکیبی فراهم می سازد، اما بسته به نوع سلول و سایر عوامل ناشناخته نقاط ضعفی در این سیستم وجود دارد. بعنوان مثال، ریکامیناز Cre ممکن است، در غیاب OH-۴ تاموکسیفن وارد هسته سلولی شود. گزارشاتی موجود است که این فعالیت پیش زمینه Cre، بوسیله اتصال Cre به دو جایگاه گیرنده استروژن رفع شده است (۱۹). همچنین، گرچه این روش کنترل زمانی خوبی را برای تحریک رویداد نوترکیبی فراهم می سازد، اثرات زیستی حذف ژن، نهایتاً به نیمه عمر پروتئین های هدف بستگی دارد، و پروتئین های پایدار با عمر بیشتر ممکن است، وقفه های زمانی قابل توجهی از زمانیکه ژن حذف می شود، تا زمانیکه پروتئین مورد نظر حذف می شود، را ایجاد کنند. اگرچه، این امر ممکن است، اهمیت ناچیزی در موش های بالغ داشته باشد، اما می تواند سنجش عملکردهای ژنی را در حین تکوین جنینی دچار اشتباه سازد. مشکل بعدی مربوط به اثرات جانبی اعمال OH-۴ تاموکسیفن در موشها برای تحریک نوترکیبی می باشد. معمولاً، OH-۴ تاموکسیفن زمانیکه در یک دوز منفرد اعمال می شود، مشکلی ایجاد نمی کند. اما تزریق مکرر آن، در موشها باعث سمیت قابل توجهی بویژه در کبد می شود. ارزیابی اصولی اثرات جانبی دوزهای OH-۴ تاموکسیفن، برای انجام آزمایشات هدف گیری ژنی بسیار مفید می باشد (۲۰).

برخلاف سیستم Cre/گیرنده استروژن، سیستم tet رونویسی ژن Cre را کنترل می کند. سیستم tet به دو دسته tet-on و tet-off تقسیم می شود. در هر دو این سیستم ها، از یک پروموتور فراگیر و یا اختصاصی بافت بهره برده می شود، تا یک پروتئین ترکیبی، مرکب از قلمروهای اتصال به DNA یعنی tTA یا rtTA و پروتئین فعال

¹⁵ Tetracycline(tet)Dependent System

¹⁶ Estradiol

¹⁷ 4-OH-tamoxifen

کننده ترانس ویروس هرپس سیمپلکس^{۱۸} به نام VP16 را بیان کند. این پروتئین ترکیبی بعنوان یک فاکتور فعال کننده رونویسی در حضور (rtTA=tet ON) و یا غیاب (rtTA=tet OFF) تتراسایکلین و یا آنالوگ آن دوکسی سایکلین^{۱۹} عمل می کند. پروموتور هدف این پروتئین ترکیبی، متشکل از چندین جایگاه اپراتوری tet است، که به پروموتور سایتومگالوویروس^{۲۰} وصل شده است و بیان ژن مورد نظر، در این مثال، ریکامیناز Cre، را تسهیل می سازد (شکل ۴). بنابراین، بیان Cre وابسته به حضور یا غیاب دوکسی سایکلین است. دوزهای کم دوکسی سایکلین، برای تحریک/سرکوب سیستم کافی می باشد، که بروز اثرات جانبی و سمی این دارو را غیرممکن می سازد. سیستم Cre/گیرنده استروژن، نیاز به ایجاد دو رده موشی تراریخته دارد (یکی حاوی آلی که در کنار جایگاه loxP قرار گرفته است، و دیگری برای بیان پروتئین ترکیبی Cre/گیرنده استروژن است). در صورتیکه، سیستم tet نیازمند سه رده موش دست ورزی ژنتیکی است: یکی حامل آلی که در کنار جایگاه loxP قرار گرفته است، دیگری بیان کننده tTA/rtTA، و بالاخره رده موشی سوم بیان کننده Cre تحت کنترل اپراتور CMV/tet. باتوجه به اینکه این دست ورزی های ژنتیکی مستقل از همدیگر هستند، سیستم tet، مستلزم زمان بیشتری است.

¹⁸ Herpes Simplex Virus Transactivator Protein

¹⁹ Doxycycline

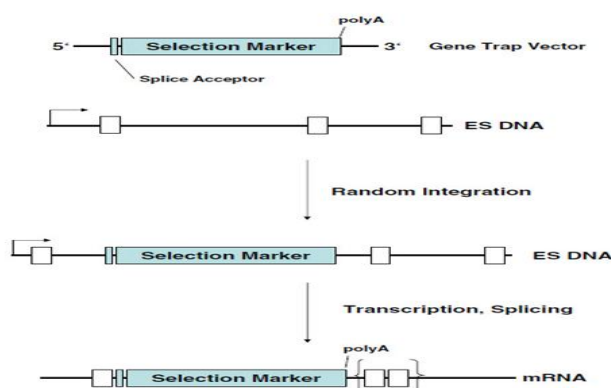
²⁰ Cytomegalovirus (CMV)

که از لحاظ هزینه و زمان مطلوب می‌باشد. در حال حاضر چندین موسسه با هم توافق کرده‌اند که کنسرسیوم بین المللی به دام اندازی ژن^{۲۸} را ایجاد کنند، که هدف مشترکشان هدف‌گیری تمام ژنهای در دسترس می‌باشد (۲۱، ۲۲).

تصادفی داخل چارچوپ یک ژن، ادغام شده باشد (در بیشتر موارد این محل، یک اینترون است)، تا بتواند، بطور فعالی رونویسی گردد. در این مورد، پروموتور داخلی ژن مربوطه، بیان یک رونوشت ترکیبی را هدایت می‌نماید. این رونوشت ترکیبی، شامل اگزونهای داخلی می‌باشند، که در بالا دست محل ورود وکتور واقع شده و همچنین شامل کاست مقاومتی نئومایسین می‌باشند. پروتئین حاصله، مرکب از بخشهایی از پروتئین هدف و پروتئینی که باعث مقاومت می‌شود، می‌باشد. ترجمه، معمولاً در پایین دست مارکر انتخابی متوقف می‌گردد و منجر به از دست رفتن آمینو اسیدهایی می‌شوند که در پایین دست محل ورود وکتور واقع شده‌اند. سپس، کلونهای ESCs که مقاوم به نئومایسین می‌باشند بوسیله RACE-PCR و توالی‌یابی شناسایی می‌شوند. متأسفانه، چندین اشکال در این روش موجود است. نخست، چون انتخاب و شناسایی کلونهای ESCs که مقاوم به نئومایسین هستند، وابسته به بیان نشانگر انتخابی هستند، از اینرو، تنها ژنهایی که در سلولهای بنیادی جنینی بیان میشوند، در این روش برای هدف‌گیری مناسب هستند. دوم، گرچه رونوشت ترکیبی منجر به ایجاد پروتئینی جهش یافته و فاقد عملکرد میشود، با اینحال، پروتئین ترکیبی ممکن است، بخشی از عملکرد خود را حفظ کرده باشد. سوم، مواردی دیده شده است، که در آنها توالی وکتور بطور نسبی دچار پردازش شده است و منجر به تولید رونوشتهای طبیعی و جهش یافته گشته است، که این امر، باعث ایجاد مدل‌های موشی ناک دان^{۲۷} و نه ناک اوت شده است. چهارم، زمانیکه جایگاه ادغام وکتور نزدیک به انتهای ۳ ژن می‌باشد، نحوه عملکرد پروتئین ترکیبی باید معلوم گردد. پنجم، بعلاوه ادغام تصادفی وکتور در داخل ژن هدف، هیچ راهی برای دست‌ورزی‌های ژنتیکی مشروط، نظیر قرارگیری ویژه جایگاه loxP، وجود ندارد. باوجود همه این اشکالات، تکنولوژی به دام اندازی ژن روشی است

²⁸International Gene Trap Consortium

²⁷Knockdown



شکل ۵. فناوری به دام اندازی ژن. سلولهای بنیادی جنینی بوسیله یک وکتور، آلوده می‌شوند. این وکتور، شامل یک توالی کد کننده برای یک مارکر انتخابی است، که باعث مقاومت به نئومایسن میشود، که در انتهای ۵' آنیکتوالیپزنده‌قوی پردازش واقع شده است. چون وکتور فاقد یک پروموتور داخلی است، برای بیان ژن مقاومت، نیاز به آن است، که وکتور بطور تصادفی داخل چارچوب یک ژن، ادغام شده باشد تا بتواند، بطور فعالی رونویسی گردد. در این مورد، پروموتور داخلی ژن مربوطه، بیان یک رونوشت ترکیبی را هدایت می‌نماید. این رونوشت ترکیبی، شامل اگزونهای داخلی می‌باشند، که در بالا دست محل ورود وکتور واقع شده و همچنین شامل کاست مقاومتی نئومایسن می‌باشند. پروتئین حاصله، مرکب از بخشهایی از پروتئین هدف و پروتئینی که باعث مقاومت می‌شود، می‌باشد [۷].

مداخله اسید ریونوکلئوتیک

روش مداخله RNA براساس تخریب RNA پیغامبر است، که با یک مولکول RNA دو رشته‌ای کوتاه همولوگ، هیبرید می‌شود. مداخله RNA، یک فرایندی طبیعی است، که احتمالاً بعنوان بخشی از سیستم دفاعی سلولی علیه RNA های دو رشته‌ای ویروسی شکل گرفته است. شواهد اخیر بیانگر این است، که مداخله RNA، ابزاری تنظیمی رایجی است که سلول برای تنظیم بیان ژن در سطح mRNA از آن بهره می‌برد (۲۳، ۲۴). بنابراین، میتوان از روش مداخله RNA برای تغییر بیان ژن استفاده نمود. آلوده سازی سلول با RNA های کوتاه مداخله گر^{۲۹} (siRNAs) روشی رایج برای ناک‌دان کردن mRNA های هدف می‌باشد. برای استفاده آنها در بدن موجود زنده (موش) siRNA ها می‌توانند یا بصورت خارجی تزریق شوند، و یا اینکه بعنوان یک ژن خارجی در سلول بیان شوند، که منجر به تولید RNA های تک رشته ای کوتاه با طول ۵۰ جفت باز می‌شود. این RNA ها دارای همولوژی داخلی می

باشند، که باعث می‌شود خودبخودی RNA های دو رشته ای کوتاه به طول ۲۱-۲۳ جفت باز، به همراه یک ساختار سنجاق سری در یک انتها ایجاد می‌کنند (که به RNA سنجاق سری کوتاه^{۳۰} معروفند). معمولاً، از پروموتورهای آنزیم پلی مرز III برای بیان این RNA های کوتاه استفاده می‌شود (۲۵). اولین رده موشی که shRNA خارجی را بیان می‌کرد، در سال ۲۰۰۲ گزارش شد. هاسووا^{۳۱} و همکارانش با موفقیت توانستند، بیان GFP را در رده موشی که بطور فراوان GFP را بیان می‌کرد، سرکوب سازند. این امر با کراس دادن موش بیان کننده GFP با رده موشی حامل کاست anti-GFP-shRNA بود، صورت پذیرفت. نتایج نشان داد که بسته به رده‌های متفاوت موشی حامل anti-GFP-shRNA، بیان GFP نسبت به نمونه های کنترل تا ۷۶-۹۶٪ سرکوب شد (۲۶). این نتایج، دو مشکل عمومی مرتبط با این روش را نشان می‌دهد؛ نخست، گرچه بیان ژن هدف بصورت قابل توجهی سرکوب شد، با اینحال مدل موشی هنوز یک "ناک‌دان" محسوب می‌شود،

³⁰Short Hairpin RNA

³¹Hasuwa

²⁹Short Interfering RNAs (siRNAs)

می کنند، بیان شده و در نتیجه، mRNA هدف بطور موضعی تخریب میگردد. در اولین گزارش مربوط به این روش، موش تراریخته‌ای که حامل ترکیب U6-loxP-EIIa-Cre⁺shRNA³³ neo-loxP-Fgfr2⁺ بود، با موش Cre⁺EIIa-Cre⁺ را در تمام سلولها کراس داده شد. موش Cre⁺EIIa-Cre⁺ بیان می کند، و در نتیجه توالی بین جایگاه‌های loxP، در همه سلولها حذف می‌شود. همانطور که در موش کلاسیک U6-Fgfr2/EIIa-Cre⁺ دیده می‌شود، موش U6-loxP-Fgfr2/EIIa-Cre⁺ در اواسط بارداری می‌میرد. در حالیکه موش U6-loxP-neo-loxP-Fgfr2/Cre⁺ که کنترل محسوب می شود، زنده می ماند. اگر موش loxP-neo-loxP-Fgfr2 با موشی که بیان Cre در آن محدود به اندام خاصی می باشد، کراس داده شود، موش Fgfr2 shRNA زنده می ماند، اما دارای ناهنجاری‌های برجسته ساختاری در اندام و انگشت‌ها می‌باشد (۲۷).

با کمک روش مداخله RNA، میتوان بیان ژن هدف را در موشهای بالغ، هم تنظیم کرد. این امر با تزریق siRNAs خارجی انجام پذیر است. رایج ترین مسیر اعمال siRNA بر اساس روشی بنام تزریق هیدرودینامیکی³⁴ استوار است، که در طی آن، 1.5-2.5 mL محلول نمک ایزوتونیک محتوی ۵۰-۵۰۰ µg بهرگدمی، بمدت 10-20 s تزریق می گردد (۲۸). این روش سخت، بطور شگفت انگیزی توسط موش تحمل می‌شود. در اولین گزارش مربوط به این روش، لوئیس³⁵ و همکارانش موفق شدند بیان لوسیفراز و EGFP را تا ۸۰-۹۰٪ در کبد، طحال، شش و پانکراس موش کاهش دهند. این اثر زودگذر بود و تنها چندین روز بطول کشید. بطور مشابهی، تزریق پر فشار داخل رگی پلاسمیدهایی که shRNA را بیان می کردند، بطور موفقیت آمیزی ویروس هپاتیت B، را در موش سرکوب

تا "ناک‌اوت". دوم، همانطور که در مورد موشهای تراریخته دیده می‌شود، اثر جایگاه کروموزومی³² بیان ژن خارجی را تحت تاثیر قرار می‌دهد، و باعث سرکوب شدن بیان ژن بطور کم و بیش می‌شود. مزایای روش مداخله RNA بسیار روشن است: نو ترکیبی همولوگ در ESCs صورت نمی پذیرد، تولید موشهای تراریخته به این روش از لحاظ هزینه و زمان نسبت به روشهای سنتی ناک‌اوت به صرفه تر می‌باشد. تاکنون، روشهای هدف گیری ژن مبتنی بر نو ترکیبی همولوگ، عمدتاً بر روی موشها انجام شده است، که این امر، بعلا محدودیت در دسترسی به ESCs سازگار در سایر گونه‌ها است. با این حال، چون در روش مداخله RNA از ESCs استفاده نمی شود، این روش در سایر گونه‌ها نیز قابل استفاده خواهد بود.

همانطور که در موشهای ناک اوت تولید شده بوسیله روش‌های سنتی دیده می شود، موشهای تراریخته shRNA می توانند، منجر به ناک‌دان ژن هدف بطور وسیعی گردند، چراکه در آن از پروموتورهای آنزیم پلی مرارز III نظیر U6 or H1 که در تمام سلولها فعال هستند، استفاده شده است. بنابراین، روشهایی توسعه یافتند، که بیان shRNA را محدود به بافت یا سلولهایی خاص کند. یک روش، استفاده از سیستم Cre/loxP است. در این سیستم برای ناک‌دان کردن موضعی بیان ژن مورد نظر، از دو رده موشی تراریخته استفاده می شود که در آن یک رده موشی Cre را تحت کنترل پروموتورهای اختصاصی بافتی بیان می‌کند، و رده دیگر حامل یک کاست بیانی نئومايسين است که در طرفین آن جایگاه loxP قرار گرفته است و این مجموعه، همگی در داخل پروموتوری واقع شده است، که رونویسی shRNA را هدایت می‌کند. در حالت عادی کاست بیانی نئومايسين فعالیت پروموتور بیان کننده shRNA را بلوکه میکند. اما وقتی که کاست بیانی نئومايسين توسط Cre برداشته می شود، shRNA در سلولهایی که Cre را بیان

³³Fibroblast Growth Factor Receptor 2

³⁴Hydrodynamic Injection

³⁵Lewis

³²Chromosomal Position Effects

کرد، که این امر بیانگر کاربرد این شیوه برای اهداف درمانی است (۲۹).

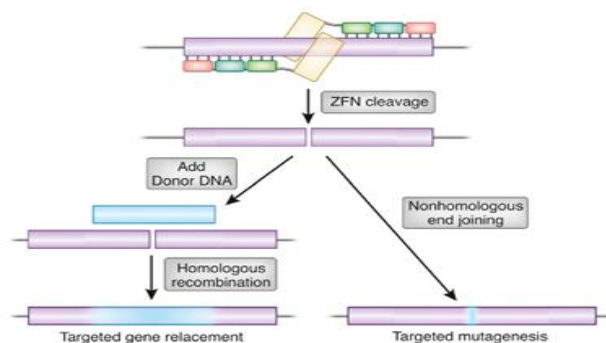
روش مداخله RNA دارای چندین اشکال عمومی می باشد. یک اشکال این است، که آلوده ساختن سلولها با RNA دو رشته ای، دستگاه دفاعی سلولی ضد ویروسی را تحریک می کند. زمانی که این دستگاه به شدت فعال شود، تاثیر مهمی بر متابولیسم سلولی می گذارد و باعث آپوپتوز می شود. بعلاوه، اثرات غیر اختصاصی (نظیر مهار mRNA هایی بجز mRNA هدف)، باید همچنین در نظر گرفته شوند. از اینرو، انتخاب کنترل های صحیح بسیار مهم است. یک روش این است، که از الیگونوکلوئیدهای تصادفی که بطور پیش فرض هیچ mRNA ای را هدف قرار نمی گیرند، استفاده کنیم تا بتوان اثرات siRNA مستقل از توالی هایشان بررسی کرد. یک روش بهتر، استفاده از کنترل های siRNA که دارای جهش های تک نقطه ای می باشند، گرچه باید توجه شود، که siRNA جهش یافته با mRNA هدف تداخل ایجاد نکند (۳۰).

نوکلئازهای انگشت روی

نوکلئاز انگشت روی (ZFN)، متشکل از دو قلمرو می باشد؛ یکی، قلمرو کاتالیتیکی که شامل شکافت آنزیم محدود کننده FokI است، و دیگری، قلمرو شناسایی DNA، که از تعدادی موتیف انگشت روی تشکیل شده است، و اتصال ZFN را به توالی DNA هدف تسهیل می سازد. یک هتروداایمر، متشکل از دو ZFN منفرد است، که در جهت ویژه ای قرار گرفته اند، و این فاصله منجر به فعال سازی قلمرو کاتالیتیکی شده و نتیجتاً باعث ایجاد شکاف در DNA دورشته ای می گردد (شکل ۶). این شکاف دو رشته ای، به دو روش ترمیم می شود. در روش اول، نوترکیبی همولوگ (با بهره گیری از آلل سالم بعنوان الگو DNA را ترمیم می کند)، اما در روش دوم که در غیاب آلل سالم اتفاق می افتد شکست DNA به وسیله

مکانیسم اتصال غیر همولوگ انتهای آزاد DNA تعمیر می شود. حالت دوم، باعث باعث تغییر توالی DNA (حذف یا ورود) در محل ترمیم می شود که برای هدف گیری ژن مناسب می باشد. ZFNs، بطور موفقیت آمیزی برای هدف گیری ژنها در دروزوفیلا^{۳۶}، ماهی گوره خری^{۳۷} و سلولهای پستانداران استفاده شده اند (۳۱). متأسفانه، ZFNs، سمیت قابل توجهی در برخی از سلولها ایجاد میکنند. این مسئله بطور نسبی با طراحی FokI جهش یافته رفع شده است. ZFN، بطور موفقیت آمیزی در موش برای حذف عملکرد ژنهای هدف شده استفاده است. تزریق mRNA رمزکننده ZFN و یا پلاسمیدهای بیانی ZFN، به داخل پیش هسته و جنین تک سلولی، منجر به ایجاد حذف هایی با طول متغیر ۳ تا ۱۸۷ باز شده است. هدف گیری در بسیاری از موارد محدود به یک آلل بوده است، ولی حذف های دو آللی هم مشاهده شده است (۳۲). طبق نتایج حاصله از موجودات مختلف، حذف DNA بوسیله ZFN، غیرقابل برگشت بوده و آلل جهش یافته میتواند، به سلولهای دیگر انتقال یابد. بنابراین، فناوری نوکلئاز انگشت روی، یک ابزار امید بخشی برای دست ورزی های ژنتیکی در پستانداران می باشد. در مقایسه با سایر روش های رایج برای غیر فعال سازی ژن، که تقریباً کاربریشان محدود به موش می باشد، این روش جدید دو مزیت کلیدی دارد: نخست آنکه، چون ESCs در این روش به کار برده نمی شوند بنابراین، این روش جدید، مناسب سایر گونه ها هم می باشد. و دوم آنکه، این روش از نظر هزینه و زمان مطلوب می باشد.

³⁶Drosophila



شکل ۶. نوکلئاز انگشت روی. نوکلئاز انگشت روی، متشکل از دو دومین می باشد. اول، دومین شکافت آنزیم محدود کننده FokI است، دوم، یک دومین شناسایی DNA می باشد، که شامل تعدادی موتیف انگشت روی می باشد، که اتصال نوکلئاز انگشت روی را به توالی DNA تسهیل می سازد. یک هتروداایمر، متشکل از دو نوکلئاز انگشت روی منفرد هست، که در جهت ویژه ای قرار گرفته اند، و این فاصله منجر به فعال سازی دومین کاتالیتیکی شده و نتیجتاً باعث ایجاد شکاف در DNA دورشته ای می گردد. این شکاف دو رشته ای، در سلول توسط نوترکیبی همولوگ (بهره گیری از آلل سالم بعنوان الگو) ترمیم می شود [۴۲].

(RVDs) گفته می شود (شکل ۷). چهار RVD مختلف بنام Asn-Gly و Asn-Asn, Asn-Ile, His-Asp بطور وسیعی به ترتیب برای شناسایی گوانین، آدنین، سیتوزین و تیمین استفاده میشوند. TALENs را میتوان طوری طراحی نمود که هر توالی از DNA را مورد هدف قرار دهد که مزیت عمده TALENs نسبت به سایر نوکلئازها می باشد (۳۳).

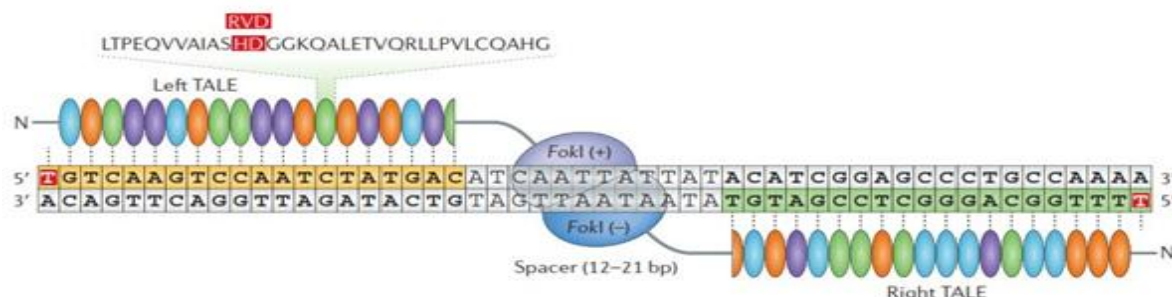
نوکلئازهای اثرگر شبه فعال کننده رونویسی

TALENs برای تغییر ژن ها در گونه های مختلفی نظیر ویروس ها، مخمر، گیاهان، نماتودها، حشرات و پستاندارانی نظیر موش و خوک مورد استفاده قرار گرفته است. ساختار کلی TALENs، مشابه ZFNs است. همانند ZFNs، TALENs دارای قلمرو نوکلئازی FokI در انتهای ناحیه کربوکسی هستند. با اینحال، آنها از دسته متفاوتی از پروتئین های متصل شونده به DNA بنام TALEs^{۳۸} بهره می برند که از باکتری بیماریزا *Xanthomonas spp* گرفته شده است.

TALEs از ردیف های پشت سرهم تکرارهای ۳۳-۳۵ اسید آمینه ای تشکیل شده اند که هریک از این ردیف ها یک جفت باز منفرد را در شیار بزرگ شناسایی می کنند. ویژگی اختصاصی هر یک از این ردیف ها توسط دو اسید آمینه که در جایگاههای ۱۲ و ۱۳ قرار گرفته اند تعیین می شود که به آنها جایگاه های متغیر دو اسید آمینه ای^{۳۹}

³⁸ Transcription activator-like effectors

³⁹ Repeat variable diresidues



شکل ۷- TALEs از ردیف های پشت سرهم تکرارهای ۳۳-۳۵ اسید آمینه ای تشکیل شده اند که هریک از این ردیف ها یک جفت باز منفرد را در شیار بزرگ شناسایی می کنند. ویژگی اختصاصی هر یک از این ردیف ها توسط دو اسید آمینه که در جایگاههای ۱۲ و ۱۳ قرار گرفته اند تعیین می شود که به آنها جایگاه های متغیر دو اسید آمینه ای (RVDs) گفته می شود [۴۳].

و در پردازش pre-crRNA شرکت می کنند. هر دو crRNA و tracrRNA با پروتئین ۹ وابسته به DNA CRISPR (Cas9) تشکیل کمپلکس داده و یک آندونوکلاز فعال را تشکیل می دهد. آندونوکلاز حاصله، توالی ۲۳ جفت بازی DNA را که مرکب از توالی ۲۰ جفت بازی راهنما (که protospacer نامیده می شود) و 5'-NGG-3' و یا 5'-NAG-3' (که موتیف کناری protospacer^{۴۲} نامیده می شود) است را شناسایی می نماید. crRNA و tracrRNA می توانند بهم دیگر متصل شوند و تشکیل RNA راهنمای تک رشته ای^{۴۳} (sgRNA) نمایند که باعث ساده تر شدن ساختار CRISPR می شود. برتری اصلی RGENs نسبت به سایر نوکلئازها، آماده سازی و طراحی ساده آنها می باشد (۳۳).

نوکلئازهای مهندسی شده تحت هدایت RNA

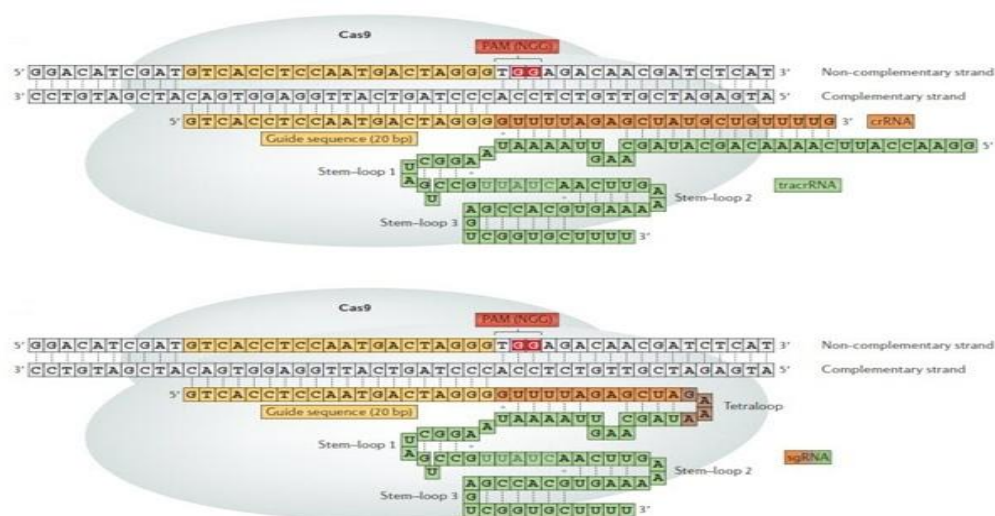
در ابتدا این نوکلئازها برای ایجاد جهش زایی هدفمند در باکتری، جنین های ماهی گوره خری و سلولهای پستانداران مورد استفاده قرار گرفتند. بعد آن زمان به بعد، این روش در سیستم های مختلفی نظیر گیاهان، نماتودها، مگس سرکه، موش و پرایمات ها توسعه یافته اند. در باکتری ها، سیستم های برش DNA تحت هدایت RNA، نوعی ایمنی اکتسابی علیه پلاسمیدها و فاژهای مهاجم فراهم می سازند. باکتریها، اغلب قطعات کوچک DNA خارجی (بطول ۲۰ جفت باز) را گرفته و این قطعات که protospacer نامیده می شوند را وارد ژنوم خود نموده تا گروه منظمی از تکرارهای پالیندرومیک کوتاه به نام CRISPR^{۴۰} را بوجود آورند. این نواحی CRISPR، رونویسی شده تا RNA پیش ساز CRISPR به نام pre-crRNA را ایجاد کنند و سپس مورد پردازش قرار گرفته تا crRNA های هدفمند را بوجود آورند. crRNA های فعال کننده ترانس (tracrRNA)^{۴۱} که همواره ثابت هستند نیز رونویسی شده

^{۴۲} Protospacer adjacent motif

^{۴۳} single-chain guide RNA

^{۴۰} clustered regularly interspaced short palindromic repeat

^{۴۱} Trans-activating crRNA



شکل ۸- هر دو crRNA و tracrRNA با پروتئین ۹ وابسته به CRISPR (Cas9) تشکیل کمپلکس داده و DNA آندو نوکلئاز فعال را تشکیل میدهد. اندونوکلئاز حاصله، توالی ۲۳ جفت بازی DNA را که مرکب از توالی ۲۰ جفت بازی راهنما (که protospacer نامیده می‌شود) و 3'-NGG-5' یا 3'-NAG-5' (که موتیف کناری protospacer نامیده می‌شود) است را شناسایی می‌نماید. crRNA و tracrRNA می‌توانند بهم دیگر متصل شوند و تشکیل RNA راهنمای تک رشته‌ای (sgRNA) نمایند که باعث ساده‌تر شدن ساختار CRISPR می‌شود [۴۳].

بحث

ژنوم موش طبیعی^{۴۷} وجود ندارند، مورد استفاده قرار می‌گیرد. دسته دوم، موشهای تراریخته شده، می‌توان با تزریق ESCs، که ژنوم آنها دست‌ورزی شده، به داخل بلاستوسیست تولید نمود (۳۹). برای این منظور، ابتدا سلولهای جنینی کشت داده می‌شوند و توسط یک قطعه DNA آلوده می‌شوند. این قطعه حاوی توالی از DNA است، که شبیه ژنی می‌باشد، که قرار است دچار تغییر شود (۴۰). سپس، آندسته از سلولهای جنینی که دچار نوترکیبی همولوگ می‌شوند، انتخاب می‌گردند. برخلاف موشهای تراریخته کلاسیک، رده‌های موشی حاصل از نوترکیبی در سلولهای جنینی، موشهای هدف گیری شده ژنی^{۴۸} نامگذاری می‌شوند، و بیانگر این امر هستند که یک ژن ویژه، دست‌ورزی شده است. در اغلب موارد این

توانایی در دست‌ورزی کردن و یا حذف یک ژن خاص در ESCs در اواخر ۱۹۸۰ ایجاد شد، که باعث توسعه هزاران رده موشی جدیدی شد، که دارای تغییرات ژنتیکی بودند. استفاده از موشها به ویژه موشهای ناک اوت^{۴۴} منجر به کسب دانش عظیمی در زمینه زیست شناسی انسان و بیماریها گردید (۳۴-۳۷). طی سالیان گذشته روشهای مختلفی برای دست‌ورزی ژنوم موش توسعه یافته‌است، که می‌توان تمام این روشها را به دو دسته اساسی تقسیم نمود. دسته اول شامل موشهای تراریخته کلاسیک است، که حاصل از تزریق قطعه DNA خارجی به نام تراژن^{۴۵} به درون پیش هسته^{۴۶} جنین تک سلولی می‌باشند، که این قطعه بطور تصادفی در ژنوم موش ادغام می‌گردد (۳۸). این روش عمدتاً برای افزایش بیان ژنهای خودی و یا بیان ژنهای هترولوگ که در

^{۴۷} Wild Type
^{۴۸} Gene Targeted

^{۴۴} Knockout Mice
^{۴۵} Transgene
^{۴۶} Pronuclear

دست‌ورزی به منظور غیرفعال کردن ژن مورد نظر صورت می‌پذیرد. رشد مدل‌های موشی تراریخته، نقاط ضعف این روشها بیشتر نمایان شده‌اند، ولی باعث بهبود فنی این روشها شده است.

نتیجه گیری

طی سالیان گذشته، دو روش ذکر شده پیشرفت کرده‌اند و میزان موفقیت برای دست‌ورزی ژنی در ژنوم موش بطور چشمگیری افزایش یافته است. هرچند به موازات تعداد روبه

تشکر و قدردانی

از زحمات کلیه اساتید و دوستانی در تیم تحقیق، گردآوری، تنظیم منابع و مطالب تشکر و قدردانی می‌گردد.

Reference

1. Ahmadian H, Hashemi E, Akhavan O, Shamsara M, Hashemi M, Farmany A, et al. Apoptotic and anti-apoptotic genes transcripts patterns of graphene in mice. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2017; 71:460-4.
2. Amirrasouli MM, Shamsara M. Comparing the in vivo and in vitro effects of hypoxia (3% O₂) on directly derived cells from murine cardiac explants versus murine cardiosphere derived cells. *J Stem Cells Regen Med* 2017;13:35-44.
3. Austin CP, Battey JF, Bradley A, Bucan M, Capecchi M, Collins FS, et al. The knockout mouse project. *Nat Genet* 2004;36: 921-4.
4. van Amerongen R, Nusse R. Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development* 2009;136:3205-14.
5. Kozar K, Ciemerych MA, Rebel VI, Shigematsu H, Zagozdzon A, Sicinska E, et al. Mouse development and cell proliferation in the absence of D-cyclins. *Cell* 2004; 118: 477-91.
6. Silva AJ, Simpson EM, Takahashi JS, Lipp HP, Nakanishi S, Wehner JM. Mutant mice and neuroscience: recommendations concerning genetic background. *Banbury Conference on genetic background in mice. Neuron* 1997;19:755-9.
7. Castrop H. Genetically modified mice-successes and failures of a widely used technology. *Pflugers Arch* 2010;459:557-67.
8. Esmaelizad M, Ahmadian G, Aghaiypour K, Shamsara M, Paykari H, Tebianian M. Induction of prominent Th1 response in C57Bl/6 mice immunized with an E. coli-expressed multi T-cell epitope EgA31 antigen against *Echinococcus granulosus*. *Folia Parasitol* 2013;60:28-34.
9. Saeedinia A, Shamsara M, Zeinoddini M, Sadeghi V, Maghsoudi N. Evaluation of nucleic acid sequence based amplification (NASBA) and reverse transcription polymerase chain reaction for detection of coxsackievirus b3 in cell culture and animal tissue samples. *Iran J Biotechnol* 2008; 6: 222-8.
10. Kan Z, Rouchka EC, Gish WR, States DJ. Gene structure prediction and alternative splicing analysis using genomically aligned ESTs. *Genome Res* 2001;11:889-900.
11. Sauer B. Inducible genetargeting in mice using the Cre/lox system. *Methods* 1998;14:381-92.

12. Sternberg N, Hamilton D. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol* 1981;150:467-86.
13. Mao X, Fujiwara Y, Orkin SH. Improved reporter strain for monitoring Cre recombinase-mediated DNA excisions in mice. *Proc Natl Acad Sci* 1999;96:5037-42.
14. Sauer B, McDermott J. DNA recombination with a heterospecific Cre homolog identified from comparison of the pac-c1 regions of P1-related phages. *Nucleic Acids Res* 2004;32:6086-95.
15. Anastassiadis K, Fu J, Patsch C, Hu S, Weidlich S, Duerschke K, et al. Dre recombinase, like Cre, is a highly efficient site-specific recombinase in *E. coli*, mammalian cells and mice. *Dis Model Mech* 2009;2:508-15.
16. Andreas S, Schwenk F, Küter-Luks B, Faust N, Kühn R. Enhanced efficiency through nuclear localization signal fusion on phage PhiC31-integrase: activity comparison with Cre and FLP recombinase in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 2002;30:2299-306.
17. Raymond CS, Soriano P. High-efficiency FLP and PhiC31 site-specific recombination in mammalian cells. *PLoS One* 2007;2:e162.
18. Sequeira Lopez ML, Pentz ES, Nomasa T, Smithies O, Gomez RA. Renin cells are precursors for multiple cell types that switch to the renin phenotype when homeostasis is threatened. *Dev Cell* 2004;6:719-28.
19. Sohal DS, Nghiem M, Crackower MA, Witt SA, Kimball TR, Tymitz KM, et al. Temporally regulated and tissue-specific gene manipulations in the adult and embryonic heart using a tamoxifen-inducible Cre protein. *Circ Res* 2001;89:20-5.
20. Wogan GN. Review of the toxicology of tamoxifen. *Semin Oncol* 1997; 24: S1-87-S1-97.
21. Nord AS, Chang PJ, Conklin BR, Cox AV, Harper CA, Hicks GG, et al. The International Gene Trap Consortium Website: a portal to all publicly available gene trap cell lines in mouse. *Nucleic Acids Res* 2006;34:D642-8.
22. Skarnes WC, von Melchner H, Wurst W, Hicks G, Nord AS, Cox T, et al. A public gene trap resource for mouse functional genomics. *Nat Genet* 2004;36:543-4.
23. Bagasra O, Prilliman KR. RNA interference: the molecular immune system. *J Mol Histol* 2004; 35:545-53.
24. Rao M, Sockanathan S. Molecular mechanisms of RNAi: implications for development and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2005;75:28-42.
25. Xia XG, Zhou H, Ding H, Affar el B, Shi Y, Xu Z. An enhanced U6 promoter for synthesis of short hairpin RNA. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: e100.
26. Hasuwa H, Kaseda K, Einarsdottir T, Okabe M. Small interfering RNA and gene silencing in transgenic mice and rats. *FEBS Lett* 2002; 532: 227-30.
27. Coumoul X, Shukla V, Li C, Wang RH, Deng CX. Conditional knockdown of Fgfr2 in mice using Cre-LoxP induced RNA interference. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: e102.
28. Wolff JA, Budker V. The mechanism of naked DNA uptake and expression. *Adv Genet* 2005; 54: 3-20.
29. McCaffrey AP, Kay MA. A story of mice and men. *Gene Ther* 2002; 9: 1563.
30. Wang Y, Juranek S, Li H, Sheng G, Tuschl T, Patel DJ. Structure of an argonaute silencing complex with a seed-containing guide DNA and target RNA duplex. *Nature* 2008; 456: 921-6.
31. McCammon JM, Amacher SL. Using zinc finger nucleases for efficient and heritable gene disruption in zebrafish. *Methods Mol Biol* 2010; 649: 281-98.

32. Geurts AM, Cost GJ, Freyvert Y, Zeitler B, Miller JC, Choi VM. Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science* 2009; 325: 433.
33. Kim H, Kim JS. A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nat Rev Genet* 2014; 15: 321-34.
34. Kazemi P, Dashtizad M, Shamsara M, Mahdavinezhad F, Hashemi E, Fayazi S, et al. Effect of blastocoel fluid reduction before vitrification on gene expression in mouse blastocysts. *Mol Reprod Dev* 2016;83:735-42.
35. Gharib S, Dashtizad M, Farokhi F, Shamsara M. Effect of artificial collapse of mouse blastocyst on viability and Wnt3 gene expression. *J Cell Mol Res* 2016; 19: 102-13. [In Persian]
36. Mahdavinezhad F, Dashtizad M, Shamsara M, Kazemi P, Fathalizade P, Zandi GH. Effect of blastocoelic fluid reduction on quality and expression of developmentally important genes in mouse blastocysts. *Int J Fertil Steril* 2015; 9: 63.
37. Zandi G, Dashtizad M, Assadi Tehrani G, Shamsara M. Expression levels of pluripotency specific markers, oct4 and nanog in ivf derived mouse blastocysts. *NCMBJ* 2016;6:65-72. [In Persian]
38. Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980. 77: 7380-4.
39. Thomas KR, Capecchi MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 1987; 51: 503-12.
40. Thomas KR, Deng C, Capecchi MR. High-fidelity gene targeting in embryonic stem cells by using sequence replacement vectors. *Mol Cell Biol* 1992;12:2919-23.
41. Kohan DE. Progress in gene targeting: using mutant mice to study renal function and disease. *Kidney Int* 2008;74:427-37.
42. Carroll D. Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics* 2011;188:773-82.
43. Kim H, Kim JS. A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nat Rev Genet* 2014;15:321-34.